

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-503685

(P2002-503685A)

(43) 公表日 平成14年2月5日 (2002.2.5)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/22		A 6 1 K 9/127	4 C 0 7 6
9/127		47/16	4 C 0 8 4
47/16		47/24	
47/24		A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	1 1 1	A 6 1 K 37/24	
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)	

(21) 出願番号 特願2000-532102 (P2000-532102)  
(86) (22) 出願日 平成11年2月12日 (1999.2.12)  
(85) 翻訳文提出日 平成12年8月21日 (2000.8.21)  
(86) 国際出願番号 P C T / I B 9 9 / 0 0 2 4 9  
(87) 国際公開番号 W O 9 9 / 4 2 0 8 5  
(87) 国際公開日 平成11年8月26日 (1999.8.26)  
(31) 優先権主張番号 9 8 1 0 3 1 1 . 5  
(32) 優先日 平成10年2月23日 (1998.2.23)  
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (E P)

(71) 出願人 シラグ・アクチエンゲゼルシャフト・イン  
ターナショナル  
スイス・シーエイチ-6300 ツーク・ランデ  
イスウントジルーシュトラッセ1  
(72) 発明者 ネフ, ライナー  
スイス・シーエイチ-8246 ラングビーゼ  
ン・シュリユツプクバーク8  
(72) 発明者 デルメニコ, サンドロ  
スイス・シーエイチ-8207 シヤフハウゼ  
ン・シュテツテマーシュトラッセ20  
(74) 代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エリスロポイエチンのリボソーム分散物

(57) 【要約】

本発明は、(a) 有効量のエリスロポイエチン、(b)  
(i) レシチン又は水素化レシチン、(ii) 場合によ  
り、荷電された電氣的陽性又は電氣的陰性の脂質化合  
物、及び (iii) コレステロールあるいは、コレステロ  
ールエステル、コレステロールのポリエチレングリコー  
ル誘導体 (P E G - コレステロール) 及びコレステロー  
ルの有機酸誘導体から選択されるその誘導体、を含んで  
なる脂質相、並びに (c) リン酸バッファー、を含んで  
なる、エリスロポイエチンのリボソームを基礎にした調  
製物、に関する。本発明の、リボソームを基礎にした非  
経口投与形態はエタノール注入法により製造される。本  
組成物はヒト血清アルブミンの使用の必要性を回避し、  
優れた安定性を示す。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) エリスロポイエチン又は骨髄細胞に網状赤血球及び赤血球細胞の生産を増加させる生物学的特性を有するその製薬学的に許容できる誘導体を含んでなる、有効量の活性成分、

(b) (i) レシチン又は水素化レシチン、

(ii) 場合により、荷電された電氣的陽性又は電氣的陰性の脂質化合物及び

(iii) コレステロールあるいは、コレステロールエステル、コレステロールのポリエチレングリコール誘導体 (PEG-コレステロール)、及びコレステロールの有機酸誘導体、から選択されるコレステロールの誘導体、

を含んでなる脂質相、並びに

(c) リン酸バッファー、

を含んでなる、リポソームを基礎にした非経口組成物。

【請求項2】 組成物が、アルコール性溶媒で脂質相の溶液を調製し、高速ホモジナイザー中に含まれたバッファー水溶液中に圧力下で溶液を注入することにより製造される単一の二重層リポソームを含んでなる、請求項1記載の組成物。

【請求項3】 それが更に安定剤を含んでなる、請求項1又は請求項2記載のリポソームを基礎にした調製物。

【請求項4】 安定剤がグリシンである、請求項3記載のリポソームを基礎にした調製物。

【請求項5】 レシチンが水素化レシチンである、請求項1ないし請求項4のいずれか1項に記載のリポソームを基礎にした調製物。

【請求項6】 荷電された電氣的陽性又は電氣的陰性の脂質化合物が、ジパルミトイルホスファチジン酸 (DPPA)、ジパルミトイルグリセロール (DPPG)、オレイルアミン及びステアarylアミンから選択される、請求項1ないし請求項5のいずれか1項記載のリポソームを基礎にした調製物。

【請求項7】 バッファーがリン酸二水素ナトリウム二水和物、リン酸水素

二ナトリウム二水和物、及びそれらの混合物から選択される、請求項1ないし請求項6のいずれか1項に記載のリポソームを基礎にした調製物。

【請求項8】 それが更に保存剤を含んでなることを特徴とする、請求項1ないし請求項7のいずれか1項に記載の、リポソームを基礎にした調製物。

【請求項9】 それが更に抗酸化剤を含んでなることを特徴とする、請求項1ないし請求項8のいずれか1項に記載のリポソームを基礎にした調製物。

【請求項10】 それが更に錯体形成剤を含んでなることを特徴とする、請求項1ないし請求項9のいずれか1項に記載の、リポソームを基礎にした調製物。

【請求項11】 それが次の組成、

	<u>g / 100 g</u>
EPO又は類似化合物	200, 000 U～百万単位
水素化レシチン（大豆）	0.5～5.000
コレステロール	0.1～1.000
荷電脂質	0.05～0.5
エタノール	0.5～5.000
グリシン	0.0～1.00
バッファー	0ないし2.0
その他の、場合による添加剤及び水	適量、全100.0、
をもつことを特徴とする、請求項1ないし請求項10のいずれか1項に記載のリポソームを基礎にした調製物。	

【請求項12】 それが次の組成、

	<u>g / 100 g</u>
エリスロポイエチン	百万単位
水素化レシチン（大豆）	0.500
コレステロール	0.100
DPPA-Na	0.040
薬局法非変性エタノール	0.500
リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.1164
リン酸水素二ナトリウム二水和物	0.2225

塩化ナトリウム

0.584

精製水

97.9371、

をもつことを特徴とする、請求項1ないし請求項7及び請求項11のいずれか1項に記載の、リボソームを基礎にした調製物。

【請求項13】 貧血の処置のための製薬学的調製物としての使用のための請求項1ないし請求項12のいずれか1項に記載の、リボソームを基礎にした調製物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## (技術分野)

本発明はエリスロポイエチンの、リポソームを基礎にした調製物に関する。なかでも、本発明は、優れた安定性を示す、エタノール注入法により調製されたエリスロポイエチンの、リポソームを基礎にした、非経口投与形態に関する。

## 【0002】

## (発明の背景)

エリスロポイエチン (EPO) は赤血球細胞合成の調節に関与する主要な因子として働く糖蛋白である。エリスロポイエチンは腎臓で生産され、骨髓内の前駆細胞を刺激してそれらを分割させ、成熟赤血球細胞に分化させることにより作用する。遺伝子組み換えにより生産された165アミノ酸の糖蛋白は、慢性腎不全、ジドビジン(zidovudine)処置HIV感染患者、化学療法中の癌患者に伴う貧血を含む、様々な形態の貧血の処置における有効な治療剤として、ある期間入手可能であった。糖蛋白は静脈内 (IV) 又は皮下 (SC) 注射のどちらかとして非経口的に投与される。

## 【0003】

現在使用されている非経口調製物は、担体としてヒト血清アルブミン (HSA) を含む、IV又はSC注射用の通常の滅菌バッファー水溶液である。このような調製物は商品名EPOGEN<sup>(R)</sup>及びPROCRIT<sup>(R)</sup>として、米国内で市販されている。これらの製品は保存剤を含まない1回投与量1ml中、又は2mlの数回投与用保存バイアル中にエリスロポイエチンを含む。

## 【0004】

これらの調製物は著しく有効であることが証明されたが、担体としてのヒト血清アルブミンの使用には幾つかの欠点に伴う。HSAは天然源から得られるので、HIV又は肝炎のような感染性疾患作用物質の担体としての潜在的な危険物であり得るので、材料の注意深いスクリーニングを実施しなければならない。更に、適切な品質のHSAの入手可能性がしばしば問題になる可能性がある。従って、担体としてHSAの使用を回避するようなエリスロポイエチンの注射可能な調

製物の必要性が存在する。

【0005】

従って、担体としてHSAの使用を回避する、エリスロポイエチンの改善された調製物を提供する試みが実施されてきた。同時に、その調製物は安定で、長期間の貯蔵寿命を提供しなければならない。更に、調製物は、それがその中に含まれるバイアルの表面に付着する活性成分に伴う問題を回避しなければならない。

【0006】

リポソームは球状の二重層に配列された、両親媒性の脂質を含んでなる小胞である。リポソームは水のチャンネルにより分離された多数の同心的脂質の二重層（多重ラメラ小胞又はMLV）を含むか、又は代替的には小さい単ラメラ小胞（SUV）又は大きい単ラメラ小胞（LUV）のどちらかの可能性がある、単一の二重層（単ラメラ小胞）を含んでいてもよい。脂質の二重層は疎水性の「尾」部分及び親水性の「頭」部分をもつ2種類の脂質の単一層からなる。膜の二重層中で、脂質の単一層の「尾」は二重層の中心に向けて配向し、一方、親水性の「頭」部は水相に向かけて配向する。

【0007】

リポソームは水の内側又は二重層の間に親水性化合物を捕捉すること、あるいは二重層内に疎水性化合物を捕捉することにより様々な物質を封入するために使用することができる。従って、それら、低い水溶性を示すか又は治療的用量において許容できない毒性を示す化合物を封入することにより生物学的に活性な物質を送達するために特に有用である。

【0008】

単一の二重層のみをもつリポソームの製造の具体的な方法は欧州特許第253619号に開示されている。様々な活性物質のリポソーム調製物が以前から知られており、エリスロポイエチンのリポソーム調製物が提唱されてきた。例えば、Maitani et al, J. Pharm. Sci. 85:440-445 (1996) は、逆相蒸発小胞法によりリポソームが調製される、経口投与を意図されたリポソームのエリスロポイエチン調製物につき開示している。その調製物は経口投与を目的としているので、リポソーム中へのEPOの高率の取り込

みが好ましい。しかし、小さい小胞中への高率の封入を示すこのような調製物は肝臓内への集中を示し、有毒症状をもたらす可能性がある。更に、そこで使用された製造法は特別な原料（例えばポリグリセリン・リン脂質）及び有機溶媒の使用を必要とする。更に、その中で使用された逆相法は非封入EPOの高度の喪失を被り、それは望ましくなく、高価である。

#### 【0009】

従って本発明の目的は、担体としてのHSAの使用を回避し、長期の貯蔵寿命期間にわたる、許容できる長期の安定性を提供し、そして、大規模製造に耐える工程により製造することができる、EPOに適した非経口調製物を提供することであった。

#### 【0010】

##### (発明の要約)

(a) エリスロポイエチン又は骨髓細胞に網状赤血球及び赤血球細胞の生産を増加させる生物学的特性を有するエリスロポイエチンの製薬学的に許容できる誘導体を含んでなる、有効量の活性成分、

(b) (i) レシチン又は水素化レシチン、

(ii) 場合により、荷電された電氣的陽性又は電氣的陰性の脂質化合物、及び

(iii) コレステロールあるいは、コレステロールエステル、コレステロールのポリエチレングリコール誘導体（PEG-コレステロール）、及びコレステロールの有機酸誘導体、から選択されるコレステロールの誘導体、

を含んでなる脂質相、並びに

(c) リン酸バッファー水溶液、

を含んでなる、リポソームを基礎にした非経口組成物。

#### 【0011】

本発明に従う組成物は、脂質相のアルコール溶液を調製し、その溶液を、高速度ホモジナイザー中に含まれたバッファー水溶液中に圧力下で注入することにより製造される単一の二重層リポソームを含んでなる。このように調製されたりポ

ソームをエリスロポイエチン活性成分とともにインキュベーションして、本発明のリポソーム分散物を形成する。

【0012】

好ましくはその活性成分は、エリスロポイエチン及び骨髄細胞に網状赤血球及び赤血球細胞の生産を増加させる生物学的特性をもつその誘導体である。EPO糖蛋白は天然源から得るか又は、引用により本明細書に取り込まれている、米国特許第4,703,008号、同第5,441,868号、同第5,547,933号、同第5,618,698号及び同第5,621,080号に開示されているような既知の方法を使用して、遺伝子組み換えにより製造することができる。

【0013】

本発明に従うと、極めて予期せぬことには、本明細書に記載の穏やかな条件下で調製されたりポソームのEPO組成物が改善された安定性を示す、すなわちリポソーム自体が安定であり、同時に生物学的に有効な物質の化学的劣化及び凝集が最小になることが発見された。更なる予期せぬ利点として、たとえEPOがリポソーム内に実質的には取り込まれておらず、その代わりに、本質的には、リポソーム分散物として間隙液中に含まれているにもかかわらず、EPO活性成分がバイアル容器又はIV管の表面に付着しない。

【0014】

(詳細な説明)

本発明に使用される活性成分はエリスロポイエチン及び骨髄細胞に網状赤血球及び赤血球細胞の生産を増加させる生物学的特性をもつエリスロポイエチンの誘導体である。本発明のリポソーム分散物は、慢性腎不全、ジドビジン処置HIV感染患者、化学療法中の癌患者に伴う貧血を含む、様々な形態の貧血のような赤血球細胞の生産低下又は障害を特徴とする血液障害の処置における非経口調製物として有用である。それはまた、鎌状細胞疾患、ベータサラセミア、嚢胞性繊維症、妊娠及び月経障害、早産の初期貧血、脊髄傷害、宇宙飛行、急性失血、老化等、のような血液学的異常の、様々な疾病状態、障害及び症状の処置における適用を有する可能性がある。好ましくは、本発明のEPO組成物は、非経口投与（



例えばIV、IM、SC又はIP)される。有効用量は処置される症状及び投与経路に応じて著しく変動することが予期されるが、活性物質を0.1(～7U)ないし100(～7000U)  $\mu\text{g}$ /体重1kgの範囲内であると予期される。貧血症状の処置に好ましい用量は毎週3回、約50ないし約300単位/kgである。

#### 【0015】

本発明のEPOリボソーム分散物は概括的に、組成物100グラム当たり、約200,000単位ないし約百万単位のEPO糖蛋白を含む。活性EPO成分は、(a)(i) レシチン又は水素化レシチン、

(ii) 場合により、荷電された電氣的陽性又は電氣的陰性の脂質化合物、及び

(iii) コレステロールあるいは、コレステロールエステル、コレステロールのポリエチレングリコール誘導体(PEG-コレステロール)、及びコレステロールの有機酸誘導体、から選択されるコレステロールの誘導体、

を含んでなる脂質相、並びに

(b) リン酸バッファー溶液、

から形成されたりボソーム懸濁物中に分散される。

#### 【0016】

特に、引用により本明細書に取り込まれている欧州特許第0 253 619号に記載の方法に従って製造されたこのような調製物は、それを、従来の当該技術分野の組成物を含むHSAに対する適切な代替物にさせるような特徴を示す。

#### 【0017】

レシチンは精製形態の天然のレシチンとして又は、好ましくは、より安定な水素化レシチンとしてのどちらでも使用することができるが、後者の使用は安定剤の濃度の減少を可能にする。レシチン成分は概括的に、組成物100グラム当たり約0.5ないし5.0グラムの量で存在する。好ましくは、水素化レシチンは、EPO及びリボソームの安定性に否定的な様態で影響を与える可能性がある、検出可能な濃度の触媒を含まない、良質の物でなければならない。

## 【0018】

コレステロールは組成物100グラム当たり、0.1ないし1.0グラムの範囲の量でリポソーム安定剤として使用される。コレステロールに加えて、コレステロールエステル、コレステロールのポリエチレングリコール誘導体（PEG-コレステロール）、並びにコレステロールの有機酸誘導体、例えばヘミコハク酸コレステロール、のようなその他のコレステロール誘導体を使用することができる。

## 【0019】

電氣的に陽性又は電氣的に陰性の脂質は陽性又は陰性に荷電した成分を有する脂質化合物である。電氣的に陽性の脂質はオレイルアミン又はステアリルアミンである。電氣的に陰性の脂質は、オレイン酸、ジパルミトイルホスファチジン酸（DPPA）、ジパルミトイルグリセロール（DPPG）、ジステアロイルホスファチジン酸（DSPA）、又はジミリスチルホスファチジン酸（DMPA）のようなホスファチジン酸である。これらの荷電脂質の使用は、リポソームを沈澱させない、蛋白光の分散物を確実に生成する荷電リポソームを生成させる。前記のように、たとえ活性成分がリポソーム内に取り込まれず、単に荷電リポソームを含む分散物として存在する場合ですら、活性エリスロポイエチン糖蛋白がその投与のために使用された容器又はケイ素管のガラス壁に付着しないという結果は極めて予想外のものである。

## 【0020】

エタノール注入法の使用により調製される組成物中には概括的に、組成物100グラム当たり、約0.5ないし約5.0グラムの範囲の量の、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール等のような1ないし6個の炭素原子の低級アルカノールからなるアルコール成分が含まれる。エタノールが好ましい。

## 【0021】

水性バッファの成分は非経口組成物中のバッファとして通常使用される典型的な酸の塩から選択される。その例はクエン酸、酢酸及びリン酸塩を含む。リン酸塩バッファが好ましい。その例は、リン酸二水素ナトリウム二水和物、又

はリン酸水素二ナトリウム二水素物及びそれらの混合物を含む。好ましくは、0ないし2.0 g/100 gの範囲の量のリン酸二水素ナトリウム二水和物及びリン酸水素二ナトリウム二水素物の混合物が使用される。

#### 【0022】

凝集物の形成を防止するために、場合によっては、組成物にグリシンのような安定剤を添加することができる。しかし、殆どの場合に、リポソームは組成物中で担体としてのみならず、安定剤として働くので、このような安定剤は必要ではない。

#### 【0023】

本発明のリポソームを基礎にした組成物は、引用により本明細書に取り入れられている、欧州特許第253619号に記載の、リポソーム組成物製造のための当該技術分野で既知の方法を適用することにより調製される。この方法においては、単一の二重層リポソームは、リン脂質及び活性成分のエタノール溶液を調製し、この溶液を、高速ホモジナイザー中に含まれたバッファー水溶液中に圧力下で注入することにより調製される。リポソームは自然に形成されて、1  $\mu$ m未満の直径をもつリポソームを提供する。なかでも、本発明の方法に従うリポソームは精製水中でバッファー水溶液を形成することにより製造される。それとは別に、レシチン、コレステロール及び荷電脂質成分をエタノールのようなアルコール溶液に溶解する。水溶液を高性能ホモジナイザーに接続して、循環させ、アルコール溶液をホモジナイザーに直接注入する。1  $\mu$ m未満のリポソームが自然に形成される。次いで、このように形成されたりポソームをEPO活性成分とともにインキュベーションすると、本発明のリポソーム分散物が形成される。

#### 【0024】

厳密に規定された直径をもつリポソームを含む透明なリポソーム分散物を得るためには、約80～100 nmの直径をもつリポソームをもたらす、約0.05～0.08 mmの孔をもつフィルターを通してリポソームを押し出すことが好ましい。この追加的な粉末度調節段階は、あらゆる凝集物を容易に検出し、血液中の循環時間を延長するために、透明な溶液を確実に生成するために使用される。

#### 【0025】

前記のように、最近発売されたエリスロポイエチン組成物は、安定性を維持し限定された貯蔵寿命をもつために、Tweens、アミノ酸等のような安定剤を含むか又は凍結乾燥して貯蔵されている。本発明のリポソーム組成物は優れた安定性を示す、すなわち、リポソーム自体が安定で、同時に、生物学的に有効な物質の分解及び凝集が最小にされることが判明した。産業的適用にとって非常に重要な、2年までの貯蔵寿命が達せられた。この改善された安定性は、本発明の優れた、穏やかな製造技術並びに調製物の成分及び組成に起因する可能性がある（文献に記載の調製物と比較されると、定性的及び定量的観点の両方から）。

#### 【0026】

組成物の安定性は更に、トコフェロール、ブチル化ヒドロキシトルエン、ブチル化ヒドロキシアニソール、パルミチン酸アスコルビル、あるいは、例えばエデト酸二ナトリウムのようなエデト酸塩（ここで、エデト酸塩は更に、存在する可能性のある重金属と結合している）のような抗酸化剤の添加により増強され得る。安定性は更に、安息香酸及びパラベン、例えばメチルパラベン及び／又はプロピルパラベン、のような保存剤の添加により増強され得る。

#### 【0027】

好ましい組成物は次の概括的処方、

	<u>g / 100 g</u>
EPO又は類似化合物	200, 000 U - 4百万単位
水素化レシチン（大豆）	0.5 ~ 5.000
コレステロール	0.1 ~ 1.000
荷電脂質	0.05 ~ 0.5
エタノール	0.5 ~ 5.000
グリシン	0.0 ~ 1.00
バッファー	0ないし2.0
その他の、場合による添加剤及び水	適量、全100.0、
のものである。	

#### 【0028】

本発明の具体的な利点を次の実施例により更に具体的に示す。

## 【0029】

## 【実施例】

(実施例1) リポソームを基礎にした分散物

次の組成、

	<u>g / 100 g</u>
エリスロポイエチン	百万単位
水素化レシチン (大豆)	0.500
コレステロール	0.100
薬局法非変性エタノール	0.500
リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.1164
リン酸水素二ナトリウム二水和物	0.2225
塩化ナトリウム	0.584
精製水	97.9771、

のリポソームを基礎にした分散物を欧州特許第0 253 619号に記載の方法に従って製造した。

方法

リポソームを80℃で、注射用水中の、リン酸二水素ナトリウム二水和物、リン酸水素二ナトリウム二水和物及び塩化ナトリウムの電解質水溶液（バッファー）を形成することにより製造する。別に、レシチン及びコレステロールを55℃～70℃で、エタノールのようなアルコール溶液中に溶解する。水溶液を高性能ホモジナイザーに接続して、循環をもたらし（ケトル1）、アルコール溶液（ケトル2）をホモジナイザー中に直接注入する。全工程中、エタノール溶液に窒素をパージした。1μm未満のリポソームが自然に形成される。厳密に規定された直径をもつリポソームを形成するために、リポソーム分散物を規定された孔（例えば0.8と0.5μm）をもつ核膜孔フィルターを通して押し出した。エリスロポイエチンをリポソーム分散物とともに温置し、後に1回滅菌濾過した。滅菌条件下でバイアルの充填を実施した。

技術的データ

ホモジナイザー速度、13,000rpmまで

エタノール溶液の流速、20～100ml/s

(実施例2) リボソームを基礎にした分散物

#### 組成

	<u>g/100g</u>
エリスロポイエチン	百万 I. U.
水素化レシチン (大豆)	0.500
コレステロール	0.100
DPPA-Na	0.040
薬局法非変性エタノール	0.500
リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.1164
リン酸水素二ナトリウム二水和物	0.2225
塩化ナトリウム	0.584
精製水	97.9371

#### 方法

実施例2のリボソーム分散物は、DPPA-Naが、エタノール注入実施前にレシチン及びコレステロールとともにエタノール溶液に添加されることを除いて実施例1の方法に従って調製される。

(実施例3) リボソームを基礎にした分散物

#### 組成

	<u>g/100g</u>
エリスロポイエチン	百万 I. U.
水素化レシチン (大豆)	0.500
コレステロール	0.100
DPPA-Na	0.050
薬局法非変性エタノール	0.500
リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.1164
リン酸水素二ナトリウム二水和物	0.2225
塩化ナトリウム	0.584
精製水	97.9271

方法

実施例3のリボソーム分散物は実施例2の方法に従って調製される。

## (実施例4) 安定性試験

2バッチのリボソームのエリスロポイエチン調製物を実施例1及び2に従って製造した。そのバッチを様々な時間において安定性を測定した。使用されたインビトロ及びインビボの生物検定方法は以下に示される。その結果は表1及び2に示される。

【0030】

【表1】

製品、エリスロポイエチンリボソーム調製物－実施例1

BN、非荷電リボソーム

用量、10,000IU/ml

貯蔵時間	貯蔵条件	外観	pH	EPO確認	ELISA	生物検定
初回	NA	合格	6.86	合格	9695	NA
3	2～8℃	合格	6.97	合格	9194	NA
3	25℃	合格	6.98	合格	8715	NA
6	2～8℃	合格	7.07	合格	9925	NA
6	25℃	合格	7.08	合格	7886	NA
9	2～8℃	合格	7.01	合格	9452	NA
12	2～8℃	合格	7.02	合格	9452	NA
18	2～8℃	N. A. N. A.		合格*	8635	NA
24	2～8℃、合格		7.05	合格	9200	8900**

\*=<2%凝集標準(2%-AGG-1")、濃度計による

\*\*インビボのマウスの生物検定

【0031】

【表2】

製品、エリスロポイエチンリボソーム調製物

BN、陰性荷電リボソーム (Na-DPPA)

用量、10,000 IU/ml

貯蔵時間	貯蔵条件	外観	pH	EPO確認	ELISA	生物検定
初回	NA	合格	6.71	合格	8757	10120
3	2~8℃	合格	7.03	合格	8776	8020
3	25℃	合格	7.02	合格	7854	N.A.
6	2~8℃	合格	7.02	合格	9621	7710
6	25℃	合格	7.06	合格	8453	N.A.
9	2~8℃	合格	7.03	合格	9189	8870
12	2~8℃	合格	N.A.	合格*	9150	N.A.
18	2~8℃	合格	6.99	合格	9003	9500**
24	2~8℃					NA

\*=<2%凝集標準(2%-AGG-1)、濃度計による

\*\*インビボのマウスの生物検定、その他はインビトロの生物検定

### 【0032】

#### インビボ生物検定

前以て低酸素症にさせた赤血球増加症のマウスのエリスロポイエチン生物検定

マウスを18時間、減圧下に置く。次の6時間、マウスを外気圧下に置く。この方法を次の14日間繰り返す。3日後に、外気圧下でマウスにエリスロポイエチンを投与する。1日後に $^{59}\text{FeCl}_3$ を含む溶液を注射する。更に2日後に、血液を分析し、赤血球中への $^{59}\text{FeCl}_3$ の取り込みを測定する。

#### インビトロ生物検定

インビトロの生物検定はエポエチンアルファの生物学的活性を正確に定量することを目的とした、細胞を基礎にした生物検定である。

### 【0033】

試料を最初に、組織培養培地中に希釈し、次いでHEP-G2の細胞培養物で処理する。この粘着性細胞系はシアル酸除去蛋白を除去するその能力において、肝臓組織のその能力を保持する。同様な代謝過程がインビボで起こり、シアル酸



除去エリスロポイエチンの活性減少をもたらすことが知られている。HEP-G2細胞による処理は培地からのエポエチンアルファ中のシアル酸含有エリスロポイエチンを除去しないであろう。従ってインビトロの生物検定はマウスのインビボ検定を模倣している。

#### 【0034】

第2の段階において、残りのエリスロポイエチンをHEP-G2細胞から分離し、B6SUA細胞系を使用して細胞の増殖の測定を実施した。これらの細胞はエリスロポイエチンの存在下で成長し、成長の度合はエリスロポイエチンの量に比例する。次いで、細胞の成長をMTTが細胞に添加される時に生成される色素の量により測定する。発色された色は細胞数及びB6SUA細胞の減少している活性に正比例する。

#### 結論

データは両調製物に対する24カ月までの良好な安定性を示す。

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年2月18日(2000.2.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) エリスロポイエチン又は骨髓細胞に網状赤血球及び赤血球細胞の生産を増加させる生物学的特性を有するその製薬学的に許容できる誘導体を含んでなる、有効量の活性成分、

(b) (i) レシチン又は水素化レシチン、

(ii) 場合により、荷電された電氣的陽性又は電氣的陰性の脂質化合物及び

(iii) コレステロールあるいは、コレステロールエステル、コレステロールのポリエチレングリコール誘導体から選択されるコレステロールの誘導体、

(iv) 1ないし6個の炭素原子の低級アルカノールからなるアルコール成分、

を含んでなる脂質相、並びに

(c) リン酸バッファー、

を含んでなる、リポソームを基礎にした非経口組成物。

【請求項2】 組成物が、アルコール性溶媒で脂質相の溶液を調製し、高速ホモジナイザー中に含まれたバッファー水溶液中に圧力下で溶液を注入することにより製造される単一の二重層リポソームを含んでなる、請求項1記載の組成物。

【請求項3】 それが更に安定剤を含んでなる、請求項1又は請求項2記載のリポソームを基礎にした調製物。

【請求項4】 安定剤がグリシンである、請求項3記載のリポソームを基礎

にした調製物。

【請求項5】 レシチンが水素化レシチンである、請求項1ないし請求項4のいずれか1項に記載のリポソームを基礎にした調製物。

【請求項6】 アルコール成分がエタノールである、請求項1ないし請求項4のいずれか1項に記載の、リポソームを基礎にした調製物。

【請求項7】 荷電された電氣的陽性又は電氣的陰性の脂質化合物が、ジパルミトイルホスファチジン酸（DPPA）、ジパルミトイルグリセロール（DPPG）、オレイルアミン及びステアシルアミンから選択される、請求項1ないし請求項6のいずれか1項に記載のリポソームを基礎にした調製物。

【請求項8】 バッファーがリン酸二水素ナトリウム二水和物、リン酸水素二ナトリウム二水和物、及びそれらの混合物から選択される、請求項1ないし請求項7のいずれか1項に記載の、リポソームを基礎にした調製物。

【請求項9】 それが更に保存剤を含んでなることを特徴とする、請求項1ないし請求項8のいずれか1項に記載の、リポソームを基礎にした調製物。

【請求項10】 それが更に抗酸化剤を含んでなることを特徴とする、請求項1ないし請求項9のいずれか1項に記載の、リポソームを基礎にした調製物。

【請求項11】 それが更に錯体形成剤を含んでなることを特徴とする、請求項1ないし請求項10のいずれか1項に記載の、リポソームを基礎にした調製物。

。

【請求項12】 それが次の組成、

	<u>g / 100 g</u>
EPO又は類似化合物	200, 000 U～百万単位
水素化レシチン（大豆）	0.5～5.000
コレステロール	0.1～1.000
荷電脂質	0.05～0.5
エタノール	0.5～5.000
グリシン	0.0～1.00
バッファー	0ないし2.0
その他の、場合による添加剤及び水	適量、全100.0、

をもつことを特徴とする、請求項1ないし請求項11のいずれか1項に記載の、リポソームを基礎にした調製物。

【請求項13】 それが次の組成、

	<u>g / 100 g</u>
エリスロポイエチン	百万単位
水素化レシチン（大豆）	0.500
コレステロール	0.100
DPPA-Na	0.040
薬局法非変性エタノール	0.500
リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.1164
リン酸水素二ナトリウム二水和物	0.2225
塩化ナトリウム	0.584
精製水	97.9371、

をもつことを特徴とする、請求項1ないし請求項8及び請求項12のいずれか1項に記載の、リポソームを基礎にした調製物。

【請求項14】 貧血の処置のための製薬学的調製物としての使用のための請求項1ないし請求項13のいずれか1項に記載の、リポソームを基礎にした調製物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正内容】

【0015】

本発明のEPOリポソーム分散物は概括的に、組成物100グラム当たり、約200,000単位ないし約百万単位のEPO糖蛋白を含む。活性EPO成分は、(a)(i) レシチン又は水素化レシチン、

(ii) 場合により、荷電された電氣的陽性又は電氣的陰性の脂質化合物、及び

(iii) コレステロールあるいは、コレステロールエステル、コレステロールのポリエチレングリコール誘導体（PEG-コレステロール）、及びコレステロールの有機酸誘導体、から選択されるコレステロールの誘導体、並びに

(iv) 1ないし6個の炭素原子の低級アルカノールからなるアルコール成分、

を含んでなる脂質相、並びに

(b) バッファー水溶液、  
から形成されたりボソーム懸濁物中に分散される。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Appl. No.  
PCT/IB 99/00249

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 A61K9/127 A61K38/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9646 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 96-461276 XP002073043 & JP 08 231417 A (CHUGAI PHARM CO LTD) see abstract	1,2,13
X	US 5 569 464 A (KENJI ENDO ET AL.) 29 October 1996	1-4,6,8,13
Y	see column 2, line 28 - line 64 see column 5, line 7 - line 8 see column 5, line 59 - column 6, line 5; example 1 see table 3	5,7,9-12
<div style="text-align: center;">-/-</div>		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<b>* Special categories of cited documents:</b> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 April 1999		Date of mailing of the international search report 03/05/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tzschoppe, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. J. Appl. Application No.  
PCT/IB 99/00249

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XIAN-RONG QI ET AL: "EVALUATION OF LIPOSOMAL ERYTHROPOIETIN PREPARED WITH REVERSE-PHASE EVAPORATION VESICLE METHOD BY SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION IN RATS" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, vol. 43, no. 2, 1 February 1995, pages 295-299, XP000494628 see abstract	1-13
Y	EP 0 253 619 A (CILAG LTD) 20 January 1988 cited in the application see column 3, line 60 - column 4, line 48 see column 5, line 8 - line 15	1-13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Info. Jond Application no

PCT/IB 99/00249

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5569464 A	29-10-1996	CA 2120197 A	03-10-1994
		EP 0622072 A	02-11-1994
		JP 6336442 A	06-12-1994
EP 0253619 A	20-01-1988	AT 71522 T	15-02-1992
		AU 598002 B	14-06-1990
		AU 7538587 A	21-01-1988
		CA 1302885 A	09-06-1992
		DE 3776015 A	27-02-1992
		DK 367187 A	16-01-1988
		ES 2055703 T	01-09-1994
		FI 873111 A, B,	16-01-1988
		GR 3003813 T	16-03-1993
		HK 78492 A	23-10-1992
		IE 60469 B	13-07-1994
		JP 2574309 B	22-01-1997
		JP 63116737 A	21-05-1988
		KR 9502146 B	14-03-1995



フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 ベツター, アンドレ  
スイス・シーエイチー8207シャフハウゼン・シユロスシユトラーセ85

(72)発明者 フレター, フランクーウルリヒ  
スイス・シーエイチー8207シャフハウゼン・ホーベルク39

Fターム(参考) 4C076 AA19 CC27 CC35 DD26Z  
DD37A DD51Q DD63F DD70F  
EE23F FF12 FF16  
4C084 AA01 BA50 CA31 DB56 MA05  
MA24 MA55 NA14 ZA811  
ZB261 ZB331